

氏 名	よこ 横 みぞ 溝 とも 智 まさ 雅
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2299 号
学位授与の日付	平 成 13 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Requirement of <i>Runx1/PEBP2αB</i> for the generation of hematopoietic cells from endothelial cells (<i>Runx1/AML1/PEBP2αB</i> は血管内皮細胞からの血液細胞の産生に必須の因子である)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 畑 龍 俊 教 授 内 山 貞 教 授 伊 藤 嘉 明

論 文 内 容 の 要 旨

転写因子 AML1 (*Runx1/PEBP2αB*) は白血病の原因遺伝子として知られており、染色体転座への関与や点突然変異が報告されている。白血病の遺伝子異常としては最も頻度が高いことから、その発症機構の解明に向けて盛んに研究が行われており、また、本来の生理的な機能についても関心が寄せられている。

AML1 ノックアウトマウスは、胎仔肝における造血の欠如を示し、胎生12.5日までに死亡する。マウスの造血には、胎生期の一時期、卵黄囊で有核赤血球を産生する胎仔型造血と、胎仔肝や脾臓、骨髓において造血幹細胞から様々な血液細胞を産生する成体型造血の二種類が存在する。*AML1* ノックアウトマウスでは、卵黄囊での造血は正常であり、胎仔肝での造血のみを欠損している。このことから、*AML1* は成体型造血に必須の因子とされていた。しかし近年の研究では、造血幹細胞は胎仔肝に移動する以前に AGM (aorta-gonad-mesonephros, 大動脈-生殖隆起-中腎) と呼ばれる領域で発生することが明らかとなり、*AML1* ノックアウトマウスにおいてどの段階で成体型造血に異常が生じているのかを知るためには、この領域を調べる必要が出てきた。また、造血幹細胞の組織学的な実体についても近年研究が進み、AGM 領域内の背側大動脈の腹側内壁に見られる血液細胞クラスターがその候補として挙げられるようになってきた。これらクラスターはあたかも血管内皮細胞から出芽しているかのような像を呈し、造血幹細胞のマーカーとして知られる c-Kit や CD34 の抗体で染色されることから、背側大動脈の血管内皮細胞から造血幹細胞が産生され、その後肝臓に移動し、そこで造血をおこなうのではないかと推測されている。

以上の知見をもとに、*AML1* ノックアウトマウスの解析をおこない、どの段階で成体型造血が阻害されているのかを検討した。その結果、*AML1* ノックアウトマウスの血管内腔には血液細胞クラスターが形成されていないことを確認した。これは、*AML1* ノックアウトマウスでは血管内皮細胞から血液細胞が産生されていないことを示唆しているが、さらに直接的な証明をおこなうために、つづいて *in vitro* での培養実験を試みた。血管内皮細胞特異的なマーカーである VE-cadherin を利用し、胎生10.5日目のマウス胎仔および卵黄囊から血管内皮細胞のみを分取し、OP9 ストローマ細胞と共培養をおこなうと、+/+, +/-マウスの血管内皮細胞からは血液細胞が分化してきたが、-/マウスではまったく分化が見られなかった。また、このアッセイでは培養した血管内皮細胞の一部がその性質を保ったまま内皮細胞のコロニーを形成するため、血管内皮細胞の性質についても同時に検討できる。*AML1* ノックアウトマウス由来の血管内皮細胞のコロニー形成能は正常マウス由来のものと大きな差を認めず、内皮細胞についてはほぼ正常であると結論づけられた。したがって、*AML1* ノックアウトマウスでは血管内皮細胞まではほぼ正常に分化が進み、そこから血液細胞に分化する段階が阻害されていると思われる。このことは、胚体、卵黄囊という部位に関わらず、血管内皮細胞から血液細胞への分化に *AML1* が必須の因子であることを示唆している。そして同時に、卵黄囊での造血に関して新たな知見をもたらしている。卵黄囊での造血については、血島で見られるような中胚葉から直接分化する経路が以前より知られていたが、これに加え、血管内皮細胞から分化する経路も存在しているのである。

論文審査の結果の要旨

AML1は転写因子をコードする遺伝子であり、そのノックアウトマウスは胎仔肝における造血の欠如を示すことから、成体型造血に必須の因子であると結論づけられていた。しかし近年の研究では、造血幹細胞は胎仔肝で発生するのではなく、背側大動脈で発生するとの見方が有力となっている。ここには血液細胞のクラスターが観察され、あたかも血管内皮細胞から出芽しているかのような像を呈していることから、造血幹細胞は血管内皮細胞から産生され则认为られている。

申請者はAML1の真の作用点を探るべくノックアウトマウスの解析をおこない、ノックアウトマウスの血管内腔には血液細胞クラスターが形成されていないことを確認した。この結果は、AML1ノックアウトマウスでは血管内皮細胞から血液細胞への分化が起きていないということを示唆している。さらに直接的な証明をおこなうために、血管内皮細胞特異的なマーカーであるVE-cadherinを利用し、マウス胎仔から血管内皮細胞のみを分取しOP9ストローマ細胞との共培養をおこなった。その結果、+/+, +/-マウスの血管内皮細胞からは血液細胞が分化してきたが、-/-マウスでは全く分化が見られなかった。これらの結果は、AML1が血管内皮細胞から血液細胞への分化に必須の因子であることを示している。この研究はAML1の機能解明に貢献し、造血幹細胞の形成過程の解明に寄与するところが多い。したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年10月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。